

PCT ENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year)
21 December 2000 (21.12.00)

To:

TANIGAWA, Hidejiro
Tanigawa and Associates, Patent
Firm
Iwata Building
6F, 5-12, Iidabashi 4-chome
Chiyoda-ku
Tokyo 102-0072
JAPON

Applicant's or agent's file reference
00PF192-PCT

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/JP00/01060

International filing date (day/month/year)
24 February 2000 (24.02.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

the applicant the inventor the agent the common representative

Name and Address MIWA, Johji 6-30, Sugitatsubonomi Isogo-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 235-0034 Japan (Applicant and inventor for all designated States)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

the person the name the address the nationality the residence

Name and Address MIWA, Johji 6-30, Sugitatsubonomi Isogo-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 235-0034 Japan (Applicant for US, inventor for all designated States)	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned
<input type="checkbox"/> the International Searching Authority	<input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned
<input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Y. KUWAHARA Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C.20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 25 October 2000 (25.10.00)
--

International application No. PCT/JP00/01060	Applicant's or agent's file reference 00PF192-PCT
International filing date (day/month/year) 24 February 2000 (24.02.00)	Priority date (day/month/year) 25 February 1999 (25.02.99)

Applicant MIKI, Keizaburo et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

22 September 2000 (22.09.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Antonia Muller Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

3 To
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

RECEIVED

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT 2002

(PCT Article 36 and Rule 70)

TC 2800 MAIL ROOM

Applicant's or agent's file reference 00PF192-PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/01060	International filing date (day/month/year) 24 February 2000 (24.02.00)	Priority date (day/month/year) 25 February 1999 (25.02.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01K 67/033, 61/00, C12N 15/11		
Applicant MIKI, Keizaburo		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report
II <input type="checkbox"/> Priority
III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention
V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited
VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application
VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 22 September 2000 (22.09.00)	Date of completion of this report 07 March 2001 (07.03.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01060

I. Basis of the report1. With regard to the **elements** of the international application:^{*} the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing: contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	3-7	YES
	Claims	1,2,8	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: WO, 95/29872, A (Univ. Leland Stanford Jr.)

Document 2: Sato M. et al, Animal Biotechnology, Vol. 5, No. 1, 1994, p. 19-31

(1) Claims 1 and 2

Based on the description in document 1, the inventions set forth in Claims 1 and 2 do not appear to be novel.

Document 1 describes a transgenic abalone in which desired foreign genes (for example, growth factor genes and the like) have been inserted and the foreign genes have been expressed.

(2) Claim 3

Based on document 1, the invention set forth in Claim 3 does not appear to involve an inventive step.

Document 1 describes a transgenic abalone, and this examination finds that persons skilled in the art can easily prepare transgenic pearl oysters by using the same methods as those applied to abalones.

(3) Claims 4 and 5

Based on document 1, the inventions set forth in Claims 4 and 5 do not appear to involve an inventive step.

The foreign gene to be inserted is a matter to be selected by persons skilled in the art.

(4) Claim 6

Based on documents 1 and 2, the invention set forth in Claim 6 does not appear to involve an inventive step.

Document 1 describes a transgenic abalone obtained by inserting a foreign gene into a fertilized egg using electroporation, and document 2 describes a transgenic mouse obtained by microinjection of a vector containing a foreign gene into mouse testes. This examination finds that because the electroporation process described in document 1 is a method that is also used in mice, it is obvious to persons skilled in the art to apply the method described in document 2 to mollusks.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01060

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of Box V (Citations and explanations):

(5) Claim 7

Based on documents 1 and 2, the invention set forth in Claim 7 does not appear to involve an inventive step.

See the explanation of Item (4) above. Furthermore, in the preparation of transgenic animals the selection and crossbreeding of individuals expressing foreign genes is a conventional procedure.

(6) Claim 8

Based on document 1, the invention set forth in Claim 8 does not appear to involve an inventive step.

Document 1 describes a transgenic abalone obtained by inserting a recombinant vector containing a promoter and foreign gene into a fertilized egg by electroporation.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01060

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

The statement "a method for preparing transgenic mollusks described in any of Claims 1-7 " in Claim 8 is unclear. The inventions set forth in Claims 6 and 7 are "a method for preparing transgenic mollusks," and judging from their content, citing them in Claim 8 is inappropriate.

特許協力条約

E P

U S

P C T

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 00PF192-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/01060	国際出願日 (日.月.年) 24.02.00	優先日 (日.月.年) 25.02.99
出願人(氏名又は名称) 三木 敬三郎		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 - この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 - この国際出願に含まれる書面による配列表
 - この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
 - 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
 - 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
 - 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. 7 A01K 67/033, A01K 61/00, C12N 15/11

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl. 7 A01K 67/033, A01K 61/00, C12N 15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 9520872, A (Univ. Leland Stanford Jr.) 10.8月. 1995 (10.08.95) & AU, 9516999, A & JP, 09508526, W & US, 5675061, A & NZ, 279759, A & SG, 49851, A1 & AU, 702639, B & AU, 9926967, A	1-5, 8 6, 7
X Y	Tsai H-J. et al., Tranegenic Research, vol. 6, p. 85-95 (1997)	1-5, 8 6, 7
X Y	Lu J-K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 93, p. 3482-3486 (1996)	1-5, 8 6, 7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

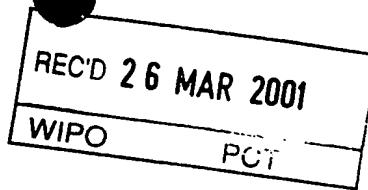
国際調査を完了した日 24. 03. 00	国際調査報告の発送日 04.04.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 長井 啓子 2B 9123 電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Powers D.A. et al., Molecular Marine Biology and Biotechnology, vol. 4(4), p. 369-375 (1995)	1-5, 8
Y		6, 7
X	Cadoret J-P. et al., Journal of Biotechnology, vol. 56, p. 183-189 (1997)	1-5, 8
Y		6, 7
Y	Sato M. et al., Animal Biotechnology, vol. 5(1), p. 19-31 (1994)	6, 7

特許協力条約

PCT

国際予備審査報告



(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

出願人又は代理人 の書類記号 00PF192-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/01060	国際出願日 (日.月.年) 24.02.00	優先日 (日.月.年) 25.02.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. A01K 67/033, A01K 61/00, C12N 15/11		
出願人（氏名又は名称） 三木 敬三郎		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 22.09.00	国際予備審査報告を作成した日 07.03.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 長井 啓子
	印
	電話番号 03-3581-1101 内線 3236

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/>	明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲 3 - 7 請求の範囲 1, 2, 8	有 無
進歩性 (I S)	請求の範囲 1 - 8	有 無
産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲 1 - 8	有 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

文献1 : WO, 9529872, A (Univ. Leland Stanford Jr.)

文献2 : Sato M. et al, Animal Biotechnology, vol. 5(1), p. 19-31 (1994)

(1) 請求の範囲1及び2について

請求の範囲1及び2に記載された発明は、文献1により新規性を有しない。

文献1には、所望の外来遺伝子（成長因子遺伝子など）が導入され、該外来遺伝子を発現するトランスジェニックアワビが記載されている。

(2) 請求の範囲3について

請求の範囲3に記載された発明は、文献1により進歩性を有しない。

文献1にはトランスジェニックアワビが記載されているが、アワビに適用したのと同様の手法によりトランスジェニック真珠貝を作出することは、当業者が容易になし得る程度のことと認める。

(3) 請求の範囲4及び5について

請求の範囲4及び5に記載された発明は、文献1により進歩性を有しない。

導入する外来遺伝子は当業者が適宜選択し得るものと認める。

(4) 請求の範囲6について

請求の範囲6に記載された発明は、文献1及び2により進歩性を有しない。

文献1には受精卵にエレクトロポレーションで外来遺伝子を導入してトランスジェニックアワビを得ることが、文献2にはマウスの精巣に外来遺伝子を組み込んだベクターをマイクロインジェクションすることによってトランスジェニックマウスを得ることが、それぞれ記載されている。文献1記載のエレクトロポレーションもマウスで採用されている方法であることからして、文献2記載の方法を軟体動物に適用してみることは当業者にとって自明な範囲のことである。

(5) 請求の範囲7について

請求の範囲7に記載された発明は、文献1及び2により進歩性を有しない。

上記コメント（4）を参照。また、トランスジェニック動物を作出する際に、外来遺伝子を発現している個体を交配、選択することは常套手段である。

VII. 国際出願の不備

この国際出願の形式又は内容について、次の不備を発見した。

請求の範囲8の「請求項1ないし7のいずれか1項に記載のトランスジェニック軟體動物の作出方法。」の記載は不明確である。請求の範囲6及び7記載の発明は「トランスジェニック軟體動物の作出方法。」であって、その内容から見ても請求の範囲8で引用することは不適切である。

補充欄（いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

第 V 欄の続き

(6) 請求の範囲 8について

請求の範囲 8 記載の発明は、文献 1 により進歩性を有しない。
文献 1 には、受精卵にプロモーター及び外来遺伝子を有する組み換えベクターをエレクトロポレーションで導入してトランスジェニックアワビを得ることが記載されている。

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 A01K 67/033, 61/00, C12N 15/11	A1	(11) 国際公開番号 WO00/49862
		(43) 国際公開日 2000年8月31日(31.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01060		(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
(22) 国際出願日 2000年2月24日(24.02.00)		
(30) 優先権データ 特願平11/48444 1999年2月25日(25.02.99) JP		添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 ; および 三木敬三郎(MIKI, Keizaburo)[JP/JP] 〒255-0004 神奈川県中郡大磯町東小磯548-7 Kanagawa, (JP)		
三輪綱司(MIWA, Johji)[JP/JP] 〒235-0034 神奈川県横浜市磯子区杉田坪呑6-30 Kanagawa, (JP)		
磯和 望(ISOWA, Nozomu)[JP/JP] 〒517-0704 三重県志摩郡志摩町越賀822-4 Mie, (JP)		
(74) 代理人 谷川英次郎(TANIGAWA, Hidejiro) 〒102-0072 東京都千代田区飯田橋4丁目5番12号 岩田ビル6階 谷川国際特許事務所内 Tokyo, (JP)		

(54)Title: TRANSGENIC MOLLUSC AND METHOD FOR CONSTRUCTING THE SAME

(54)発明の名称 トランスジェニック軟体動物及びその作出方法

(57) Abstract

A transgenic mollusc capable of expressing a desired foreign gene. This transgenic mollusc is one capable of expressing a desired foreign gene (excluding genes imparting viral resistance) which has been transferred thereto. This transgenic mollusc can be constructed by microinjecting into the male and/or female mollusc gonads the desired foreign gene to be transferred or a recombinant vector obtained by integrating a nucleic acid containing the foreign gene into a vector, crossing the male and female to give the first generation and then selecting an individual with the expression of the desired gene as described above.

(57)要約

所望の外来遺伝子を発現することができるトランスジェニック軟体動物及びその作出方法が開示されている。この軟体動物は、所望の外来遺伝子（ウイルス抵抗性を付与する遺伝子を除く）が導入され、該外来遺伝子を発現するトランスジェニック軟体動物である。このトランスジェニック軟体動物は、導入しようとする所望の外来遺伝子又は該外来遺伝子を含む核酸をベクターに組み込んだ組換えベクターを軟体動物のオス及び／又はメスの生殖巣にマイクロインジェクションし、これらのオスとメスを交配させて第1代を作り、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択することにより作出できる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	K Z	カザフスタン	R U	ロシア
A G	アンティグア・バーブーダ	D Z	アルジェリア	L C	セントルシア	S D	スードーン
A L	アルバニア	E E	エストニア	L I	リヒテンシュタイン	S E	スウェーデン
A M	アルメニア	E S	スペイン	L K	スリ・ランカ	S G	シンガポール
A T	オーストリア	F I	フィンランド	L R	リベリア	S I	スロヴェニア
A U	オーストラリア	F R	フランス	L S	レソト	S K	スロヴァキア
A Z	オゼルバイジャン	G A	ガボン	L T	リトアニア	S L	シェラ・レオネ
B A	ボズニア・ヘルツェゴビナ	G B	英国	L U	ルクセンブルグ	S N	セネガル
B B	バルバドス	G D	グレナダ	L V	ラトヴィア	S Z	スワジランド
B E	ベルギー	G E	グルジア	M A	モロッコ	T D	チャード
B F	ブルギニア・ファン	G H	ガーナ	M C	モナコ	T G	トーゴー
B G	ブルガリア	G M	ガンビア	M D	モルドヴァ	T J	タジキスタン
B J	ベナン	G N	ギニア	M G	マダガスカル	T M	トルクメニスタン
B R	ブラジル	G R	ギリシャ	M K	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	T R	トルコ
B Y	ベラルーシ	G W	ギニアビサオ	共和国		T T	トリニダッド・トバゴ
C A	カナダ	H R	クロアチア	M L	マリ	T Z	タンザニア
C F	中央アフリカ	H U	ハンガリー	M N	モンゴル	U A	ウクライナ
C G	コンゴー	I D	インドネシア	M R	モーリタニア	U G	ウガンダ
C H	スイス	I E	アイルランド	M W	マラウイ	U S	米国
C I	コートジボアール	I L	イスラエル	M X	メキシコ	U Z	ウズベキスタン
C M	カメルーン	I N	インド	M Z	モザンビーク	V N	ヴェトナム
C N	中国	I S	アイスランド	N E	ニジエール	Y U	ユーロースラヴィア
C R	コスタ・リカ	I T	イタリア	N L	オランダ	Z A	南アフリカ共和国
C U	キューバ	J P	日本	N O	ノールウェー	Z W	ジンバブエ
C Y	キプロス	K E	ケニア	N Z	ニュージーランド		
C Z	チエコ	K G	キルギスタン	P L	ポーランド		
D E	ドイツ	K P	北朝鮮	P T	ポルトガル		
D K	デンマーク	K R	韓国	R O	ルーマニア		

明細書

トランスジェニック軟體動物及びその作出方法

技術分野

本発明は、トランスジェニック軟體動物及びその作出方法に関する。

5

背景技術

従来の真珠養殖では、ひたすら幾種類かの天然に存在する真珠の生産のみが可能であり、色調などは生産後に染色などで色調加工を行なってきた。これら生産後の加工は色調が退色しやすく、また望みの色調に加工することは真珠層の強固なことからほとんど不可能であった。

10

発明の開示

もし、着色真珠を產生する能力等を有するトランスジェニック真珠貝が得られれば、養殖真珠産業にとって有利である。しかしながら、このような有用な性質を有するトランスジェニック真珠貝は言うに及ばず、軟體動物門全体においても、所望の外来遺伝子を発現することができるトランスジェニック軟體動物は現在までのところ作出されていない。

従って、本発明の目的は、所望の外来遺伝子を発現することができるトランスジェニック軟體動物及びその作出方法を提供することである。

20

本願発明者らは、銳意研究の結果、所望の外来遺伝子を軟體動物のオス及びメスの生殖巣にマイクロインジェクションし、それらのオスとメスを交配することにより、又は軟體動物中で機能するプロモーターの下流に所望の外来遺伝子を連結したものを軟體動物の受精卵又は胚に導入することにより、所望の外来遺伝子を発現するトランスジェニック軟體動物を作出することに成功し、本発明を完成了。

25

すなわち、本発明は、所望の外来遺伝子（ウイルス抵抗性を付与する遺伝子を除く）が導入され、該外来遺伝子を発現するトランスジェニック軟體動物を提供する。また、本発明は、導入しようとする所望の外来遺伝子又は該外来遺伝子を含む核酸をベクターに組み込んだ組換えベクターを軟體動物のオス及び／又はメスの生殖巣にマイクロインジェクションし、これらのオスとメスを交配させて第

1代を作り、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択することを含む、上記本発明のトランスジェニック軟體動物の作出方法を提供する。さらに本発明は、形質転換しようとする軟體動物中の本来の遺伝子ないしこれを修飾したプロモーター活性を発揮するプロモーターの下流に、前記所望の遺伝子を機能的に連結した核酸を組み込んだ組換えベクターを該軟體動物の受精卵又は胚に導入し、該受精卵又は胚を個体にまで成長させ、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択することを含む、上記本発明のトランスジェニック軟體動物の作出方法を提供する。

本発明により、所望の外来遺伝子を発現することができるトランスジェニック軟體動物が初めて提供された。本発明により、着色真珠を形成する真珠貝等の産業上有用な種々の軟體動物を作出することが可能になった。

発明を実施するための最良の形態

本発明のトランスジェニック軟體動物は、軟體動物門に属する動物であればいずれのものでもよいが、好ましい例として、ニマイガイ綱（斧足類）やマキガイ綱（腹足類）のような貝類、とりわけ、アコヤガイ、シロチョウガイ、クロチョウガイのような真珠貝を挙げることができる。

軟體動物に導入される所望の外来遺伝子は、軟體動物に付与しようとする形質を与えることができるいずれの遺伝子であってもよい（ただし、ウイルス抵抗性を付与する遺伝子を除く）。好ましい例として、軟體動物が真珠貝の場合には、緑色蛍光発光タンパク質（GFP：グリーンフルオレスンスタンパク質）遺伝子、アントシアニン遺伝子、蛍光ルシフェラーゼ遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 fosfataーゼ遺伝子等の着色に関与する遺伝子を挙げができる。なお、ここで、「着色に関与する遺伝子」とは、上記の例示からも明らかのように、色素（蛍光色素を包含する）をコードする遺伝子のみならず、体内で色素を生成する反応を触媒する酵素をコードする遺伝子等、体内での色素生成反応に関与する物質をコードする遺伝子をも包含する。

本発明のトランスジェニック軟體動物は次のようにして作出することができる。第一の方法では、上記所望の外来遺伝子又は該外来遺伝子を含む核酸をベクター

に組み込んだ組換えベクターを、軟体動物のオス及び／又はメスの生殖巣にマイクロインジェクションにより注入し、これらのオスとメスを交配して第1代の個体を作り、該第1代の個体の中から上記所望の外来遺伝子を発現している個体を選択する。

5 マイクロインジェクションされる組換えベクターに組み込むべきものは、上記所望の外来遺伝子のみであってもよいし、該外来遺伝子を含む核酸であってもよい。このような核酸の例として、該外来遺伝子の上流に、軟体動物細胞中でプロモーター活性を発揮するプロモーターを結合したもの及び該外来遺伝子を他の遺伝子と融合させた融合遺伝子等を挙げることができる。なお、ここで、上記所望の外来遺伝子と融合される他の遺伝子の好ましい例として、外来遺伝子が着色に関与する遺伝子であり、軟体動物が真珠貝の場合には、真珠層タンパク質遺伝子、プリズム層骨格タンパク質遺伝子、炭酸カルシウム結晶化酵素遺伝子等を挙げることができる。ベクターとしては、アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターのような動物細胞用ベクターを挙げができる。これらのベクターは市販されているので、市販品を用いることができる。

10

15

上記組換えベクターを軟体動物の生殖巣にマイクロインジェクションする方法について説明する。基本的には、組換えベクターを含む溶液を注射針で直接生殖巣内に注入することにより行なうことができる。マイクロインジェクション用の溶液の媒体としては、TE緩衝液のような緩衝液でよく、溶液中の組換えベクターの濃度は、2～200μg/ml程度が好ましく、特には5～10μg/ml程度が好ましい。注入する溶液の量は、1箇所につき10～50μl程度が好ましく、卵巣、精巣とも2～4箇所程度に注入することができる。

20

マイクロインジェクション後、10～25°C、好ましくは15～20°Cで24～72時間、好ましくは24～48時間放置した後、マイクロインジェクションしたオスとメスを交配させる。交配は自然交配でもよいが、再現性良く確実に交配させるために人工授精を行なうことが好ましい。人工授精は、基本的に、マイクロインジェクションした精巣からの精子をマイクロインジェクションしたメスの卵巣中の成熟卵に添加することにより行なうことができる。なお、マイクロイ

25

ンジェクションは、交配させるオス及びメスの両者の生殖巣に対して行うことが好ましいが、いずれか一方の生殖巣に対して行ってもトランスジェニック軟体動物を作出することが可能である。軟体動物の人工授精の方法自体はDev Biol 199 4, 163(1): 162-174 (この文献はこの明細書に組み入れられたものとする) 等に記載の方法により行なうことができる。

受精卵からの個体の育成は、受精卵を海水又は人工海水中で、その軟体動物の通常の生育温度範囲でインキュベートすることにより容易に行なうことができる。

次いで、得られた個体から形質転換体を選択する。これは、軟体動物の細胞中に、導入しようとする所望の外来遺伝子が存在するか否かをサザンプロット法により調べ、さらに軟体動物細胞で該外来遺伝子が発現されているか否かをノーザンプロット法により調べることにより行なうことができる。サザンプロット法及びノーザンプロット法自体及びそのための試料の調製方法自体はこの分野において周知であり、例えば中山・西方著、「バイオ実験イラストレイテッドー②遺伝子解析の基礎」、秀潤社(1995)に記載されている。

形質転換ラインを確立するために、上記の方法により形質転換体であることが確認された第一代の軟体動物のオス及びメスを上記と同様にして交配させ、第二代の個体を得、その中から上記と同様にして形質転換体を選択することが好ましい。さらに第三代以降を同様にして作ることにより、より確実に形質転換ラインを確立することが可能である。

トランスジェニック軟体動物を作出する第二の方法では、形質転換しようとする軟体動物中でプロモーター活性を発揮するプロモーターの下流に、前記所望の遺伝子を機能的に連結した核酸を組み込んだ組換えベクターを該軟体動物の未受精卵、受精卵又は胚に導入し、該未受精卵、受精卵又は胚を個体にまで成長させ、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択する。

形質転換しようとする軟体動物中でプロモーター活性を発揮するプロモーターは、形質転換しようとする軟体動物中でプロモーター活性を発揮するものであればいずれのものであってもよく、例えばアクチン遺伝子プロモーター、熱ショックプロテイン遺伝子プロモーター等を挙げることができるがこれらに限定される

ものではない。また、所望の外来遺伝子をプロモーターの下流に「機能的に連結」するとは、該外来遺伝子が該プロモーターの支配を受けるように読み枠を合わせて連結することを意味する。この場合、プロモーターの下流に機能的に連結された他の構造遺伝子又はその断片の下流に上記所望の外来遺伝子を読み枠を合わせて連結して、融合タンパク質として発現させることも可能である。なお、プロモーターの下流に構造遺伝子を機能的に連結する方法はこの分野において周知である。組換えベクターは、第1の方法と同様にして調製することができる。

次いで、調製した組換えベクターを軟体動物の未受精卵、受精卵又は胚、好ましくは未受精卵に導入する。これは例えば次のようにして行なうことができる。

濃度100～200mg/ml程度のベクター溶液をシャーレあるいはウェルに用意し、未受精卵あるいは受精卵又は胚を浸す。このように浸した卵あるいは胚をマイクロインジェクション用マイクロピペットを用いて（これに限るものではない）鋭利に一瞬だけ傷を付けるようにしてベクター液を卵あるいは胚内に注入する。この時、破裂は勿論のこと致命傷にならない程度に傷穴を空けることが肝心である。組換えベクターを導入した受精卵又は胚から第1の方法と同様にして個体を得ることができ、第1の方法と同様にして形質転換体を選択し、形質転換ラインを確立することができる。

また、未受精卵は上記操作の直後あるいは並行して人工授精を行った後、第1の方法と同様にして個体を得ることができる。

20 実施例

以下、本発明を、実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

参考例1 ヒトインターフェロン α 遺伝子を導入したトランスジェニックアコヤガイの作出

ヒトあるいはマウスインターフェロン α 遺伝子(BBL社、RDS社より市販)をアデノウイルスベクター(宝酒造社製、タカラ・アデノウイルス発現ベクターキット)に組み込み組換えベクターを作製した。この操作は具体的には次のようにして行なった。上記市販のインターフェロン α 遺伝子をコスミドベクター(

pAxcwt (44,741 bp), Niwa, M. et al., (1991) Gene 108, 193, 上記市販のアデノウイルス発現ベクターキットに含まれている) のSwa I部位に挿入した。組み込まれた遺伝子を持つコスミドベクターと、上記制限酵素で処理した上記市販のアデノウイルス由来DNA-TPC (Miyake, S. et al., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 1320) とを293細胞 (ヒト胎児腎細胞、大日本製薬株式会社製) に共存導入した。共存導入は、具体的には次のように行った。293細胞を10%FCS添加DMEM培地で、5%CO₂、37°Cの条件下に100%コンフルエントに培養し、上記コスミドベクターDNA 10 μgと制限酵素処理済みDNA-TPC 5 μgとを直径6cmのシャーレ上で混合した。このトランسفエクションはリン酸カルシウム法で行った。共存導入後の細胞を37°C、5%CO₂で24時間培養後、増殖した組換えアデノウイルスの分画を集め、DNA量(100~200mg/個)をアコヤ貝の卵巣に注入し、別にオスから取出した精子(卵子の2倍量)と試験管内で混合し受精させた。これを海水中25°Cで、24日間培養し、稚貝を得た。200個の稚貝31個中に、インターフェロン用DNAプローブの蛍光(FITC)の発色が見られた。さらに稚貝のDNAを精製し、同じDNAプローブにより配列を確認した。これらの貝は継続養殖された。

また、ウイルス感染により閉殻筋が赤色に変化することが報告されており、インターフェロン遺伝子の存在が確認された成貝では、20個中18個でこの積変が見られなかった。

一方、上記のようにして得た組換えアデノウイルスベクターをHeLa細胞にトランسفクトし、HeLa細胞中で増殖させた。HeLa細胞へのトランسفクト及び増殖は、Nature 1995, 374(6523):660-662に記載された方法により行なった。HeLa細胞から常法により組換えベクターDNAを回収し、これを10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTAないし20 mMリン酸カリウム、3 mMクエン酸カリウム、2% PEG-6000 (pH7.5) 中にDNA量50~100 μg/mlの濃度で溶解してマイクロインジェクション用溶液を調製した。該溶液を、アコヤガイのメスの卵巣及びオスの精巣にマイクロインジェクションした。注入した溶液の量は、1箇所当たりDNA換算100 μgで、卵巣又は精巣にそれぞれ3箇所注入した。24~48

時間後、精巣からの精子と卵巣からの成熟卵を用いて人工授精を行なった。人工授精は具体的には次のようにして行なった。アコヤ貝のオスより精巣を、メスより卵巣をそれぞれ切除し、試験管に精子と卵子を取り出し1:2の割合で混合した。受精卵を海水中で2~3週間、25°Cでインキュベートすることにより受精卵から第一代のアコヤガイ個体を得た。得られたアコヤガイの生殖巣から常法により全DNAを回収し、ヒトインターフェロン α 遺伝子をプローブとして用いて常法（「バイオ実験イラストレイテッド」、上掲）によりサザンプロット法を行なった。さらに、アコヤガイの内臓塊、閉殻筋細胞から常法により全mRNAを回収し、ヒトインターフェロン α 遺伝子をプローブとして用いて常法（「バイオ実験イラストレイテッド」、上掲）によりノーザンプロット法を行なった。

サザンプロット陽性かつノーザンプロット陽性のメス及びオスの個体から採取した成熟卵及び精子を用いて上記と同様に人工授精を行い、上記と同様にして第2代の個体を得た。上記と同様にサザンプロット及びノーザンプロットを行なうことにより、ヒトインターフェロン α 遺伝子を導入したトランスジェニックアコヤガイを3ライン選択した。

養殖アコヤガイの状態から、ウイルス汚染されていると考えられる海域及びウイルス汚染されていないと考えられる海域において、上記のように作出了したトランジスジェニックアコヤガイ及び対照として従来のアコヤガイを180日間養殖し、その致死率を比較した。結果を下記表1に示す。

表1 ヒトインターフェロン α 遺伝子導入の効果(360日間養殖)

アコヤガイ	致死率(%)	
	非汚染海水	汚染海水
従来種	10	95
ライン1	6	30
ライン2	1	35
ライン3	7	32

表1から明らかなように、本発明のトランジスジェニックアコヤガイ(ライン1~3)では、非汚染海域における致死率は従来種と同等であるにもかかわらず、汚染海域における致死率は従来種よりも遥かに低かった。このことから、ヒトインターフェロン α 遺伝子導入による致死率低下の効果が明瞭に認められた。

参考例2 ヒトインターフェロン β 遺伝子を導入したトランスジェニックアコヤガイの作出

ヒトインターフェロン α 遺伝子に代えて、ヒトインターフェロン β 遺伝子(BBL社より市販、HIGASHI, Y. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258:92)を用いること、及びササンプロット及びノーザンプロットで用いたプローブがインターフェロン β 遺伝子の5'末端40塩基ないし50塩基の配列フラグメントをFITC蛍光で修飾したプローブを用いたことを除き、参考例1と同じ操作を行い、ヒトインターフェロン β 遺伝子が導入されたトランスジェニックアコヤガイ(第2代)を作出した。

ヒトインターフェロン β 遺伝子導入の効果を参考例1と同様にして調べた。結果を下記表2に示す。

表2 ヒトインターフェロン β 遺伝子導入の効果(180日間養殖)

アコヤガイ	致死率(%)	
	非汚染海域	汚染海域
従来種	11	94
ライン1	10	28
ライン2	14	22
ライン3	12	15

参考例1の場合と同様、ヒトインターフェロン β 遺伝子導入の効果が明瞭に認められた。

実施例1 緑色蛍光発光タンパク質(GFP)遺伝子を持つアコヤガイの作製(1)
完全長GFP遺伝子(Science 1994, 263:802-805; GenBank No. U53602、和光純薬工業より市販)を参考例1と同様にしてアデノウイルスベクターへ組み込んだ(増殖に用いた細胞は293細胞)。得られたGFP含有組換えベクターをT_E緩衝液で濃度100mg/mlとし、参考例1と同様にしてアコヤガイの卵巢にマイクロインジェクションした。以下、参考例1と同様にして(ただし、ササンプロット及びノーザンプロットで用いたプローブはGFP遺伝子である)、トランスジェニックアコヤガイ(第2代)を作出した。

得られたトランスジェニックアコヤガイの各組織において蛍光発光が認められるか否かを蛍光顕微鏡により調べた。結果を下記表3に示す。なお、表中「+」は

蛍光発光が認められたことを示し、「+」の数が多いほど蛍光発光が強いことを意味する。

表3 蛍光発光の認められた組織

トランスジェニック アコヤガイ	内臓塊	心房	閉殻筋	外套膜	足
ライン1	+++	++	++	+++	++
ライン2	+	+	+	+	+++
ライン3	+++	+++	++	+++	++

実施例2 緑色蛍光発光タンパク質(GFP)遺伝子を持つアコヤガイの作製(2)

5 真珠貝のプリズムタンパク質は、真珠を構成している重要なタンパク質である。この実施例では、プリズムタンパク質の遺伝子に緑色蛍光発光タンパク質遺伝子を融合し、真珠に自己蛍光発光をさせる試みである。

10 アコヤガイのプリズムタンパク質遺伝子 (Nature 1997, 387 (6633) :563-564 (この明細書に組み入れられたものとする); GenBank No. D860/3) をその読み始めコドン5 kb上流を含めてクローンし、このプロモーターにGFP遺伝子を融合し、アデノウイルスベクターに導入した。プリズムタンパク質遺伝子(プロモーター含む)とGFP遺伝子の融合遺伝子は、M. Chalfie et al., Science 1994, 263:802-805 (この明細書に組み入れられたものとする)に記載された方法により調製した。すなわち、上記読み始めコドン5 kb上流を含むプリズムタンパク質遺伝子の開始コドンから10 nt目に、9 nt、10 nt又は11 ntのリンカーポリTを結合し、市販のGFP遺伝子の5'末端に、それぞれ9、10、あるいは11 ntのポリAリンカーを結合させたDNAをハイブリダイズして、融合遺伝子を得た。得られた融合遺伝子を制限酵素NHeI及びEcoRIを用い、参考例1で用いたのと同じアデノウイルスベクターに挿入した。次いで参考例1と同様にして、プリズムタンパク質遺伝子とGFP遺伝子との融合遺伝子を導入したトランスジェニックアコヤガイを得た。得られたトランスジェニックアコヤガイの外套膜組織を蛍光顕微鏡で観察したところ、蛍光発光を認めた。

15 20 25

本実施例で得られたトランスジェニックアコヤガイは、プリズムタンパク質のプロモーター及び構造遺伝子の下流にGFP遺伝子を連結したものであり、これが発現されて蛍光が認められているので、このアコヤガイに真珠を作らせれば、

真珠を構成するプリズムタンパク質にはGFPが融合しているから、蛍光発光する真珠玉が形成されると考えられる。

実施例3 緑色蛍光発光タンパク質(GFP)遺伝子を持つアコヤガイの作製(3)

外套膜タンパク質は、プリズムタンパク質と同様に真珠を構成する大切なタンパク質である。実施例2のプリズムタンパク質遺伝子に代えてアコヤガイ外套膜タンパク質遺伝子 (Nature 1997, 387 (6633): 563-564 (この明細書に組み入れられたものとする); GenBank No. 86074) を用いて実施例2と同様な操作を行ない、外套膜タンパク質遺伝子とGFP遺伝子との融合遺伝子を導入したトランスジェニックアコヤガイを作出した。なお、アコヤガイ外套膜タンパク質遺伝子とGFP遺伝子との融合及び該融合遺伝子とアデノウイルスベクターへの組み込みは、具体的には次のように行なった。実施例2と同様、外套膜タンパク質の開始コドン約5kb上流を含むDNA断片の開始コドンから15b目に9、10あるいは11ntのポリTを結合し、実施例2で用いたと同様のGFP遺伝子に9、10、11ntのポリAをハイブリダイズして融合遺伝子を作製した。得られた融合遺伝子を用いて実施例2と同様な操作を行い、トランスジェニックアコヤガイを得た。

得られたトランスジェニックアコヤガイの外套膜組織を蛍光顕微鏡で観察したところ、蛍光発光を認めた。

本実施例で得られたトランスジェニックアコヤガイは、外套膜タンパク質のプロモーター及び構造遺伝子の下流にGFP遺伝子を連結したものであり、これが発現されて蛍光が認められているので、このアコヤガイに真珠を作らせれば、真珠を構成する外套膜タンパク質にはGFPが融合しているから、蛍光発光する真珠玉が形成されると考えられる。

実施例4 プロモータートラップ法によるGFP遺伝子又はLacZ遺伝子の導入

基本的にはI. A. Hope, Development 113巻339-408 (1991年) (この明細書に組み入れられたものとする) の方法によった。先ず、実施例1に記載した方法により精巣及び卵巣にGFP遺伝子 (10~50mg DNA/個) を注入し、のち試験管内で受精させた。これを海水中25°Cで培養し、3週間で稚貝を得た。約

5～15%の稚貝にGFP特有の発色が認められた。これらを養殖槽で12ヶ月間養殖し、成貝を得た。成貝を解剖し、特によく発色している臓器を単離し、DNAを抽出した。抽出されたDNA中にGFP遺伝子を発現するプロモーター遺伝子配列を解析した。タンパク質合成酵素や閉殻筋中の酵素のプロモーター遺伝子がトラップされた。

新しく単離されたプロモーター領域を含む配列の下流にGFPあるいはLacZ遺伝子を挿入し、発現ベクターpAxCAwt（タカラアデノウイルス発現ベクターキット）からβ-アクチンプロモーターを制限酵素により切除したもののSwa I制限部位（サイトメガロウイルスエンハンサー配列とウサギβ-グロビンポリAシグナルの間）に、得られた遺伝子を導入した。得られた組換えベクターを用い、濃度100～200mg/ml程度の該ベクター溶液をシャーレに用意し、未受精卵を浸した。このように浸した未受精卵をマイクロインジェクション用マイクロピペットを用いて鋭利に一瞬だけ傷を付けるようにしてベクター液を卵に注入した。以後、参考例1と同様にしてトランスジェニックアコヤガイを得た。それぞれの遺伝子の発現量は分光学的に検出した。

得られたトランスジェニックアコヤガイについて、自己蛍光発光（GFP遺伝子の場合）及び発色基質X-Gによる染色（LacZ遺伝子の場合）による観察の結果、アコヤガイの種々の組織に蛍光発光あるいは染色が認められた。

産業上の利用可能性

20 本発明によれば、所望の性質を有するトランスジェニック軟体動物を提供できる。これにより、例えば有色真珠を産出するアコヤガイ等の産業上有用な軟体動物を提供できる。

請求の範囲

1. 所望の外来遺伝子（ウイルス抵抗性を付与する遺伝子を除く）が導入され、該外来遺伝子を発現するトランスジェニック軟體動物。
2. 貝類である請求項1記載のトランスジェニック軟體動物。
- 5 3. 真珠貝である請求項2記載のトランスジェニック軟體動物。
4. 前記外来遺伝子は、着色に関する遺伝子であり、いずれかの組織が着色された請求項1ないし3のいずれか1項に記載のトランスジェニック軟體動物。
5. 前記着色に関する遺伝子は、緑色蛍光発光タンパク質遺伝子であり、いずれかの組織が蛍光を発する請求項4記載のトランスジェニック軟體動物。
- 10 6. 導入しようとする所望の外来遺伝子又は該外来遺伝子を含む核酸をベクターに組み込んだ組換えベクターを軟體動物のオス及び／又はメスの生殖巣にマイクロインジェクションし、これらのオスとメスを交配させて第1代を作り、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択することを含む、請求項1ないし5のいずれか1項に記載のトランスジェニック軟體動物の作出方法。
- 15 7. 前記所望の遺伝子を発現している前記第1代のオスとメスを交配して第2代を作り、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択することをさらに含む、請求項6記載の方法。
8. 形質転換しようとする軟體動物中でプロモーター活性を発揮するプロモーターの下流に、前記所望の遺伝子を機能的に連結した核酸を組み込んだ組換えベクターを該軟體動物の未受精卵、受精卵又は胚に導入し、該未受精卵、受精卵又20 は胚を個体にまで成長させ、前記所望の遺伝子を発現している個体を選択することを含む、請求項1ないし7のいずれか1項に記載のトランスジェニック軟體動物の作出方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01060

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' A01K 67/033, A01K 61/00, C12N 15/11

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' A01K 67/033, A01K 61/00, C12N 15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 9520872, A (Univ. Leland Stanford Jr.),	1-5, 8
Y	10 August, 1995 (10.08.95)	6, 7
	& AU, 9516999, A & JP, 09508526, W	
	& US, 5675061, A & NZ, 279759, A	
	& SG, 49851, A1 & AU, 702639, B	
	& AU, 9926967, A	
X	Tsai H-J. et al., Tranegenic Research, vol.6, p.85-95	1-5, 8
Y	(1997)	6, 7
X	Lu J-K. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., vol.93,	1-5, 8
Y	p.3482-3486(1996)	6, 7
X	Powers D.A. et al., Molecular Marine Biology and	1-5, 8
Y	Biotechnology, vol.4(4), p.369-375 (1995)	6, 7
X	Cadoret J-P. et al., Journal of Biotechnology, vol.56,	1-5, 8
Y	p.183-189 (1997)	6, 7
Y	Sato M. et al., Animal Biotechnology, vol.5(1), p.19-31	6, 7
	(1994)	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 March, 2000 (24.03.00)

Date of mailing of the international search report
04.04.00

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Faxsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. 7 A01K 67/033, A01K 61/00, C12N 15/11

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl. 7 A01K 67/033, A01K 61/00, C12N 15/11

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS, MEDLINE, WPIDS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 9520872, A (Univ. Leland Stanford Jr.) 10.8月. 1995 (10.08.95) & AU, 9516999, A & JP, 09508526, W & US, 5675061, A & NZ, 279759, A & SG, 49851, A1 & AU, 702639, B & AU, 9926967, A	1-5, 8 6, 7
X Y	Tsai H-J. et al., Tranegenic Research, vol. 6, p. 85-95 (1997)	1-5, 8 6, 7
X Y	Lu J-K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., vol. 93, p. 3482-3486 (1996)	1-5, 8 6, 7

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 03. 00

国際調査報告の発送日

04.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

長井 啓子



2B 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3236

C(続き)	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X Y	Powers D. A. et al., Molecular Marine Biology and Biotechnology, vol. 4(4), p. 369-375 (1995)	1-5, 8 6, 7
X Y	Cadoret J-P. et al., Journal of Biotechnology, vol. 56, p. 183-189 (1997)	1-5, 8 6, 7
Y	Sato M. et al., Animal Biotechnology, vol. 5(1), p. 19-31 (1994)	6, 7